

Exhibit 3

Experimentelle Untersuchungen zur Gewerbeverträglichkeit von Antiseptika

A. Kallenberger, Chr. Kallenberger und H. Willenegger

Einleitung

Der Begriff „Antisepsis“ wurde erstmals von JOHN PRINGLE (17), einem englischen Militärarzt, für fäulnisverhindernde Mittel geprägt. Aber erst LISTER hat mit Einführung des Karbolverbandes (13), bzw. mit Anwendung chemischer Antiseptika zur lokalen Wundbehandlung ein bleibendes Konzept geschaffen, das vor allem in Deutschland rasche Verbreitung fand. Wegen schwerer Nebenwirkungen wie Hautangrän und allgemeinen Vergiftungserscheinungen, sogar mit tödlichem Ausgang, wurde nicht das Konzept, wohl aber die Karbolsäure als Antiseptikum schließlich ganz aufgegeben.

So führte z. B. KOCHER (11) die antiseptische Wundbehandlung nach LISTER (3, 12, 13) mit schwachen Chlorzinklösungen weiter. In der Folge wurden chlorhaltige Lösungen (ALEXIS CARREL verwendete Dakinsche Lösung während des 1. Weltkriegs 1914-18), Sublimat (ROBERT KOCH), Jodoform (BILLROTH), Azofarbstoffe (z. B. Rivanol) und Sulfonamide (z. B. Cibazol) lokal verwendet.

Mit der Entdeckung des Penicillins verloren die chemischen Antiseptika an Bedeutung. Leider hielten die anfangs spektakulären Erfolge, insbesondere der lokalen Penicillinanwendung wegen zunehmender Resistenzbildung nicht an, so daß nach Alternativpräparaten gesucht werden mußte. Dabei stellten wir erstmals fest, daß bisherige Substanzen, die lokal verwendet wurden, zwar bakteriologisch durchgetestet waren, daß aber der Frage der experimentellen Erprobung ihrer Gewerbeverträglichkeit keine Beachtung geschenkt worden war. Da in unserem Labor mit Zellkulturen gearbeitet wurde, lag es nahe, Fibroblastenkulturen zur Prüfung der Zellkompatibilität einzusetzen. Dabei konnten wir allein schon wesentliche Unterschiede zwischen verschiedenen physiologischen Salzlösungen feststellen.

Physiologische Kochsalzlösung führte zu erheblichen Zellschädigungen, während z. B. Ringerlösung gut toleriert wurde. Auch die getesteten Antibiotika wiesen bei vergleichbaren bakteriziden Konzentrationen unterschiedliche Zellverträglichkeit auf (9). Von besonderem Interesse war das nicht resorbierbare Kombinationspräparat Polybactrin® (Bacitracin, Neomycin, Polymyxin), das sich bei sehr guter antibakterieller Wirkung auch als ausgesprochen zellfreundlich erwies. Damit glaubten

Experimental Investigations on Tissue Compatibility of Antiseptics

A. Kallenberger, Chr. Kallenberger and H. Willenegger

Introduction

The term of "antisepsis" was first created by JOHN PRINGLE (17), an English medical officer, and was used as an expression for substances preventing putrefaction. But it was LISTER (13) who, in 1867 with the introduction of the phenol dressing created a fixed conception for the local treatment of wounds, which rapidly became especially wide-spread in Germany. Due to severe side-effects as e.g. cutaneous gangrene, general signs of poisoning, and even fatal outcome not the conception itself, but the use of carbolic acid was finally ceased.

In 1881 KOCHER e.g. (11) continued the antiseptic treatment of wounds according to LISTER (3, 12, 13) by dilute zinc chloride solutions. Subsequently chloridic solutions were used as e.g. by ALEXIS CARREL, who applied Dakin's solution during World War I (1914-1918), sublimate solution was used by ROBERT KOCH, Iodoform was used by BILLROTH, and furthermore azo dyes as e.g. Rivanol, and sulfonamides as e.g. Cibazol were locally applied.

With the development of penicillin the chemical antiseptics lost their importance. Unfortunately, the first tremendous successes, especially of the local application of penicillin, were restricted by growing bacterial resistance so that alternative preparations had to be looked for. In this stage we found out for the first time that previous substances which had been locally applied were tested for their bacteriological efficacy, but not for their tissue compatibility. As in our laboratory we have been working with cell cultures, it seemed reasonable to employ fibroblast cultures for testing of the cell compatibility. Only during these test procedures we could recognize clear differences between several physiologic saline solutions.

Physiologic saline solution lead to severe cell damage, while Ringer's solution was well tolerated. Also the antibiotics tested revealed different degrees of cell compatibility in comparably bactericidal concentrations (9). In this context the non-absorbable compound preparation Polybactrin® (bacitracin, neomycin, polymyxin), which stood out by good antiseptic efficacy and extremely good cell compatibility as well. Thus it seemed to be the ideal antibiotic for local treatment of wounds. Unfortunately, proceeding resistance also to this polyvalent antibiotic did not fail to appear. Even on the basis of the knowledge

HYGIENE+

wir, das ideale Antibiotikum für die lokale Wundbehandlung gefunden zu haben. Leider blieb die Resistenzbildung auch gegenüber diesem polyvalenten Antibiotikum nicht aus. Schon aufgrund der damaligen Erkenntnisse über Erregeresistenz und Resistenzentwicklung (1) war damit zu rechnen, daß die antibakterielle Wirksamkeit wohl jedes Antibiotikums nach längerem Gebrauch durch bakterielle Abwehrmechanismen eingeschränkt wird: In dieser Situation lag es nahe, nach einer chemischen Substanz zu suchen, die sich zur lokalen Wundbehandlung eignet.

Unter verschiedenen chemischen Substanzen mit guter bakteriostatischer bzw. bakterizider Wirkung (chlorhaltige Lösungen, organische Silberverbindungen, alkoholische Gemische mit quartären Ammoniumbasen) haben sich für die antiseptische Wundbehandlung insbesondere die Jodophore in der Chirurgie und Chlorhexidin in der Zahnheilkunde durchgesetzt. Wegen des Jodgehaltes und entsprechender Nebenwirkungen ist jedoch das Anwendungsspektrum der Jodophore begrenzt (7). Chlorhexidin kann die Epithelproliferation (14) und die Bildung von Granulationsgewebe hemmen (2, 16). Zudem erwies es sich als lediglich bakteriostatisch (19).

Diese Situation brachte GOOD (5) auf die Idee, einem bereits bekannten Biguanid (Polyhexanidum, PHMB) – mit guter Bakterizidie und minimaler Toxizität – Polyethylenglykol beizufügen um die hohe Oberflächenspannung dieses Biguanids, zwecks optimaler Benetzung der Wundflächen, herabzusetzen. So entstand aus einem für die Wundbehandlung ungeeigneten Desinfektionsmittel ein vielversprechendes Antiseptikum, das unter der Bezeichnung „GX“¹ experimentell geprüft wurde. In der vorliegenden Studie berichten wir über Methoden und Ergebnisse der Gewebeverträglichkeitsprüfung.

Zur Prüfung der Gewebeverträglichkeit wurden folgende Methoden eingesetzt:

1. Testung an Zellkulturen (Fibroblasten)
2. Testung an Gewebekulturen (Explantationsversuche)
3. Testung an Organkulturen (Explantationsversuche)
4. Wundheilungsversuche.

1 Testung an Zellkulturen

Die Prüfung der Zellverträglichkeit an kultivierten Fibroblasten verschiedener Herkunft (Bindegewebe von Kaninchen, humane Haut oder Gingiva) ergab ausgezeichnete Ergebnisse bei der Testung von Antibiotika in bakteriostatischer Konzentration (9), brachte aber unbefriedigende Resultate bei der Testung von Antiseptika in bakterizider Konzentration. Erwartungsgemäß wurden die einschichtigen Zellkulturen durch den Kontakt mit Antiseptika in bakterizider Konzentration und Einwirkungsdauer meistens irreversibel geschädigt, so daß nach einer Methode gesucht werden mußte, die den klinischen Gegebenheiten einer infizierten Wunde besser entspricht. Im Falle einer infizierten Wunde erreicht die antiseptische Lösung eine Oberfläche, welche aus Fibrin mit zerfallenen und überreifen Granulozyten besteht,

we had at that time about the resistance of pathogenic organisms and the development of resistance (1) we had to expect that the antiseptic efficacy of nearly all antibiotics would have to face restrictions by bacterial defence mechanisms after long-term administration; in this situation it suggested itself to look for a chemical substance suitable for local treatment of wounds.

Among different chemical substances with good bacteriostatic and bactericidal efficacy for the antiseptic treatment of wounds (solutions containing chlorine, organic silver compounds, alcoholic mixtures with quaternary ammonium bases) especially the iodophores prevailed in surgery as well as chlorhexidine did in dentistry. Due to the iodine contents and the respective side-effects, however, the spectrum of application of the iodophores is limited (7). Chlorhexidine might inhibit the proliferation of epithelium (14) and granular tissue (2, 16). Furthermore, it turned out to be bacteriostatic only (19). This situation gave GOOD (5) the idea to add polyethylene glycol to an already well-known biguanide (polyhexanidum, PHMB) with good bactericidal efficacy and minimal toxicity, in order to reduce the high surface tension of this biguanide in order to guarantee optimal spreading on the surface of wounds. Thus, out of an inappropriate disinfectant for the treatment of wounds a promising antiseptic was developing, which was experimentally tested under the label of „GX“¹. In the present study we will report on methods and results of the tissue compatibility test.

For testing of tissue compatibility the following methods were employed:

1. Testing on cell cultures (fibroblasts)
2. Testing on tissue cultures (explantation tests)
3. Testing on organ cultures (explantation tests)
4. Tests on wound healing.

1 Testing on Cell Cultures

The testing of cell compatibility on cultivated fibroblasts of different origin (connective tissue of rabbits, human skin or gingiva) led to excellent results for the testing of antibiotics (9) in bacteriostatic concentration, whereas the results of tests with antiseptics in bactericidal concentration were dissatisfactory. According to our expectations the monostatal cell cultures were irreversibly damaged by the contact with antiseptics in bactericidal concentration and duration of action, so that methods had to be looked for, which were more appropriate to the clinical conditions of an infected wound. In case of an infected wound the antiseptic solution reaches a surface consisting of fibrine disintegrated and hypermature granulocytes. Beyond there is either fresh granular tissue or compact fibrous or tyctic connective tissue respectively. A lesion of the surface layer can be justified as long as the antiseptic does not lead to necrotisation of deeper tissue layers, to vessel lesions or hemorrhages, which could result in impairment of tissue regeneration or could

¹ Lavasept®. Schweiz

¹ Lavasept®. Switzerland

Darunter liegt je nach Alter der Läsion junges Granulationsgewebe oder derb fibröses bis schwieliges Bindegewebe. Eine Schädigung der Oberflächenschicht ist daher zu verantworten, solange das Antiseptikum nicht zur Nekrotisierung tieferer Gewebeschichten, zu Gefäßläsionen und Hämorrhagien führt, was zu einer Hemmung der Geweberegeneration oder gar zu neuen Prädispositionsstellen für bakterielle Infektionen führen könnten. Wir suchten deshalb nach einem Modell, das es ermöglicht, zu beurteilen, ob in einem mit Antiseptika vorbehandelten Gewebe proliferationsfähige Zellen noch vorhanden sind. Dazu entwickelten wir den sogenannten *Explantationstest*, bei dem Gewebepartikel in vitro kultiviert werden. Die aus den Partikeln herauswachsenden Zellen sind ein direktes Maß für die Vitalität des Gewebes (8).

2 Explantationsversuche mit Rattenherzgewebe

2.1 Methodik

Als Substrat für die In vitro-Kultur wählten wir Rattenherzen, um für jeden Versuch steriles Gewebe mit konstantem histologischem Aufbau einsetzen zu können. Nachteil der Methode ist, daß für jeden Versuch ein anderes Spendertier genommen werden muß, was bedingt, daß die zu vergleichenden Versuche mit gleichgeschlechtlichen Tieren aus 1 Wurf und innerhalb von 2-3 Tagen durchgeführt werden müssen.

Whistar Labor-Ratten wurden mit Chloroform getötet, das Herz unter sterilen Kautelen freigelegt, am Gefäßtrunkus abgebunden und freipräpariert. Dann wurde das ganze Herz während 1 Stunde in der zu prüfenden Lösung inkubiert, anschließend 3mal während 2 Minuten in Ringerlösung gespült. Als Kontrolle wurde ein gleich präpariertes Herz 1 Stunde in Ringerlösung inkubiert (Abb. 1 links). Zur Explantation wurde die rechte Herzkammer verwendet, die durchwegs eine Wanddicke von ca. 2 mm aufweist. Das Gewebe wurde mit Starmesserschere in 3 mm breite Streifen zerteilt und diese weiter unterteilt in 2-3 mm lange Stückchen. Je 8-10 solcher Gewebepartikel wurden auf Deckgläser gelegt; 4-5 Deckgläser wurden in Corning-Kulturflaschen eingeschoben, mit Cellophan bedeckt und mit Nährlösung überschichtet (Kulturmedium Mc Coy mit 30% Kälberserum) (Abb. 1 rechts).

Pro Versuch wurden 70-80 Explantate beurteilt. Kulturdauer 8 Tage im CO₂-Incubator bei 37 °C.

Am 8. Tag wurden die Explantate unter dem Mikroskop betrachtet und ausgezählt, wieviele der Explantate von Zellsäumen umgeben waren. Anschließend wurden die Deckgläser fixiert, mit Methylambian gefärbt und nach Entfernung der Gewebestückchen eingebettet. Im gefärbten Präparat sind weiße Zentren von blau gefärbten Zellsäumen (Auswachszone) umgeben (Abb. 2).

2.2 Beurteilungskriterien

2.2.1 Auswachsrate

Anzahl der Explantate mit Auswachszone resp. Zellsäumen in Prozent der angesetzten Explantate.

2.2.2 Fläche der Auswachszone

Die Flächenmessung erfolgte nach Umrandung der Auswachszone am gefärbten Präparat unter der Binokularlupe (Abb. 2). Die Konturen wurden anschließend auf

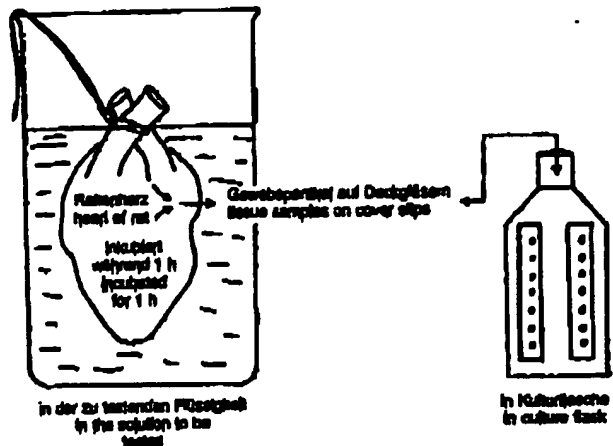


Abbildung 1:
Gewerbeverträglichkeit von Antiseptika
Explantationstest; In vitro-Kultur von Rattenherzgewebe

Figure 1:
Tissue compatibility of antiseptics
Explantation test; In vitro culture of rat heart tissue

work as a source for the formation of fresh pathogenic organisms. Therefore, we were looking for a pattern, enabling us to evaluate whether in a tissue pretreated with antiseptics proliferative cells can be found. For this purpose we developed the so-called *explantation test* in which tissue particles are cultivated in vitro. Those cells proliferating from the particles constitute a direct measure for the vitality of the tissue (8).

2 Explantation Tests with Rat Heart Tissue

2.1 Method

As substrate for the in vitro culture we chose rat hearts in order to be able to employ sterile tissue with constant histologic structure in each test. The disadvantage of this method is that each experiment requires another donor animal, a fact which presupposes that the tests to be compared to each other have to be performed on animals of the same sex and of the same brood within 2 to 3 days. Whistar laboratory rats were killed with chloroform, the heart was layed bare, ligated from the vessel trunk and exposed. Then the complete heart was incubated in the test solution for one hour, and afterwards rinsed three times for 2 minutes in Ringers' solution. As a control test a similarly prepared heart was incubated in Ringers' solution for one hour (Figure 1, left). For explantation the right ventricle was used which shows an overall wall thickness of 2 mm. The tissue was dissected into 3 mm strips, which were again cut up into pieces of 2 to 3 mm length. 8 to 10 of such tissue particles each were placed on cover slips. 4 to 5 of the cover slips were put into Corning's culture flasks, covered by cellophane, and overlaid by nutrient medium (culture medium Mc Coy together with 30% calf-serum) (Figure 1, right).

For test 70 to 80 explants were evaluated. The cultivation was performed in a CO₂-incubator at 37 °C for 8 days.

On the 8th day the explants were examined under the microscope and those explants which were surrounded

HYGIENE

Millimeterpapier durchgezeichnet und die Fläche durch Auszählung der Quadrate ermittelt. Die auf einem Deckglas ermittelte Gesamtfläche wurde durch die Anzahl der explantierten Gewebepartikel dividiert. Dadurch erhält man die mittlere Größe der Auswachszone eines explantierten Partikels.

2.3 Geprüfte Substanzen

Alle Antiseptika wurden mit Ringerlösung verdünnt. Ausgangslösungen waren „GX“, Braunol® und Betadine®. Handelsformen mit einem Gehalt von 10% Jod. Die Prozentangaben beziehen sich bei den Jodophoren auf den Jodgehalt. Folgende Lösungen wurden getestet:

„GX“	0,1%	0,2%	0,4%
Braunol®	1,0%	2,0%	5,0%
Betadine®	1,0%	2,0%	5,0%

Ringerlösung als Kontrolle.

2.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Explantationsversuche mit Rattenherzgewebe sind in den Tabellen 1 und 2 (Anwachsarten) sowie 3 und 4 (Fläche der Auswachszone) zusammengestellt.

2.4.1 Auswachsarten

Nach Vorbehandlung mit „GX“ 0,1%, 0,2%, 0,4% während einer Stunde entsprechen die Anwachsarten denjenigen der Kontrollversuche (Tab. 1).

Nach Vorbehandlung mit den Jodophoren Braunol® und Betadine® waren die Anwachsarten mit Ausnahme eines einzigen Versuchs statistisch signifikant herabgesetzt (Tab. 2).

2.4.2 Auswachszone

Einen wesentlich feineren Aussagewert haben die Auswachszone, die um so größer sind, je mehr proliferationsfähige Zellen im Explantat vorhanden sind.

Nach Vorbehandlung mit „GX“ 0,1% entsprechen die Auswachszone den Kontrollen. Nach „GX“ 0,2% waren

by a cell margin were counted. Afterwards the cover slips were fixed, and stained with methylene blue, and embedded after removal of the tissue particles. In the stained preparation there are white centers surrounded by blue-coloured cell margins (proliferation zones).

2.2 Evaluation Criteria

2.2.1 Rate of Cell Proliferation

Number of explants with proliferation zones or cell margins respectively (in per cent of the explants prepared).

2.2.2 Area of the Proliferation Zones

Measurement of the proliferation zones was done after outlining the proliferation zones on the stained preparation under the binocular magnifier (Figure 2). The contours were then drawn on graph paper and the measurement of the area was performed by counting the squares. The total plane determined on each cover slip was divided by the number of the explanted tissue particles. Thereby the mean value of the extension of the proliferation zone of an explanted particle is obtained.

2.3 Substances tested

All antiseptics were diluted with Ringers' solution. Primary solutions were "GX" concentrate and commercial preparations of Braunol® and Betadine® with an iodine contents of 10%. The data given in per cent are related to the iodine contents. The following solutions were tested:

„GX“	0,1%	0,2%	0,4%
Braunol®	1,0%	2,0%	5,0%
Betadine®	1,0%	2,0%	5,0%

Ringers' solution was employed for control purposes.

2.4 Results

The results of the explantation tests on rat heart tissue are compiled in Tables 1 and 2 (proliferation rates) as well as in Tables 3 and 4 (measurement of the proliferation zones).

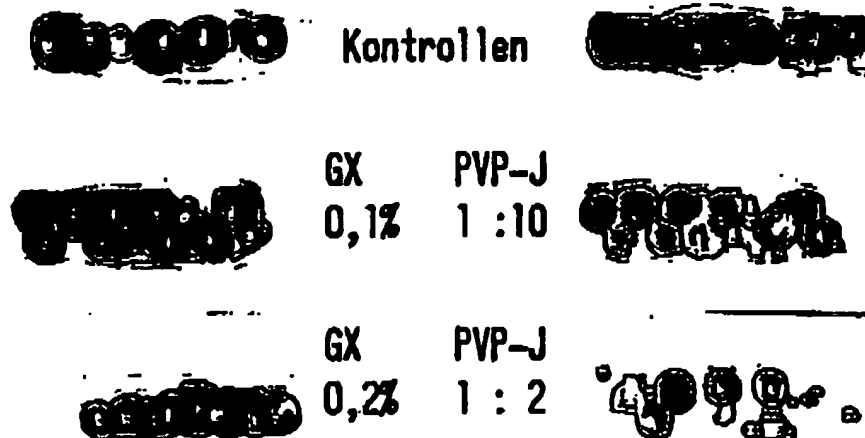


Abbildung 2:
Gewebeverträglichkeit von Antiseptika
Explantations-test: Rattenherzgewebe (in vitro-Kultur)
Blaue Fläche = Auswachszone um Explantat

Figure 2:
Tissue compatibility of antiseptics
Explantation test: Rat heart tissue (in vitro culture)
Blue area: Proliferation zones surrounding the explants

A. Kallenberger, Chr. Kallenberger und H. Willenaggen: Experimentelle Untersuchungen zur Gewerbeverpflichtung von Antisepika

**HYGIENE +
MEDIZIN**

Tabelle 1:

Auswachsrate von Rattenherzexplantaten nach einstündiger Vorbehandlung mit Ringerlösung (Kontroll-explantate) resp. GX in verschiedenen Konzentrationen (Test-explantate). Jeder Versuch wurde mit 70-80 Explantaten durchgeführt.

Table 1:

Proliferation rates of rat heart explants after 1-hour preparation with Ringer's solution (control explants) as well as pretreatment with GX respectively in different concentrations (test explants). Each test was performed on 70 to 80 explants.

Versuchs-Nr. Test No.	"GX" Kon- zentration in %	% Explantate mit Wachstumszonen Kontroll- explantate Control explants	% Explants with proliferation zones Test- explants Test explants	Differenz Difference
TC 663/664	0,1	97,14	98,57	+1,43
TC 753/753	0,1	100,00	100,00	0
TC 781/779	0,1	97,22	92,50	-4,72
TC 786/784	0,1	97,50	98,75	+1,25
TC 663/662	0,2	97,14	100,00	+2,86
TC 753/751	0,2	100,00	97,50	-2,50
TC 781/780	0,2	97,22	100,00	+2,78
TC 781/783	0,2	97,22	100,00	+2,78
TC 663/665	0,4	97,14	97,50	+0,36
TC 786/785	0,4	97,50	96,25	-1,25

Die statistische Auswertung der Versuche (Mann-Whitney-Test) ergaben keine signifikanten Unterschiede.

The statistic evaluation of the tests (Mann-Whitney-Test) did not reveal any significant differences.

sie einmal signifikant größer, einmal signifikant kleiner, und bei 2 Serien lagen sie im Bereich der Kontrollen. Erst nach Vorbehandlung mit "GX" 0,4% waren die Auswachsrate in allen Versuchen signifikant kleiner als bei den Kontrollen (Tab. 3).

Demgegenüber waren die Auswachsrate nach Vorbehandlung mit Jodophoren in allen Versuchen signifikant kleiner als bei den Kontrollen. Die entsprechende Signifikanz lag bei Betadine® in allen Versuchserien unter 0,001. Bei Braunol® lag die Signifikanz bei Behandlung mit der 5%-Lösung zwischen 0,001 und 0,01, bei Vorbehandlung mit der 1%- und 2%-Lösung zwischen 0,01 und 0,2 (Student-t-Test) (Tab. 4).

Versuchs-Nr. Test No.	Jodophor Iodophore	Konzentration in % Concentration in %	% Explantate mit Wachstumszonen Kontroll-explantate Control explants	% Explants with proliferation zones Test-explantate Test explants	Differenz Difference
TC 661/674	Braunol®	1,0	100,00	73,20	-26,80
TC 753/746	Braunol®	2,0	100,00	100,00	0
TC 617/621	Braunol®	5,0	100,00	94,28	-5,72
TC 634/636	Braunol®	5,0	100,00	86,28	-13,72
TC 770/771	Betadine	1,0	100,00	82,50	-17,50
TC 770/776	Betadine	1,0	100,00	93,61	-6,39
TC 770/772	Betadine	2,0	100,00	78,75	-21,25
TC 770/773	Betadine	5,0	100,00	61,25	-38,75

Die Unterschiede sind außer bei den Versuchen TC 753/746 statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test). Das heißt, die Auswachsrate sind nach Vorbehandlung der Rattenherzexplantate mit Jodophoren herabgesetzt.

The differences are statistically significant (Mann-Whitney Test) with the exception of the tests TC 753/746. That is to say that the proliferation rates are reduced after pretreatment of the rat heart explants with iodophores.

2.4.1 Proliferation Rates

After pretreatment with "GX" 0.1%, 0.2%, 0.4% for the duration of one hour the data of the proliferation rates are equal to those during the control test (Table 1).

After pretreatment with the Iodophores Braunol® and Betadine® the proliferation rates were, with the exception of one single test, statistically significantly reduced (Table 2).

2.4.2 Proliferation Zones

Of a more confined informative value are the proliferation zones, which are the larger the more proliferative cells are contained in the explant.

After pretreatment with "GX" 0.1% the proliferation zones were equal to those in the control tests. After "GX" 0.2% they were once significantly enlarged, once significantly reduced, and in two series they were within the range of the controls. Only after pretreatment with "GX" 0.4% the proliferation zones were significantly smaller than in the controls (Table 3).

In contrast to these results the proliferation zones were significantly smaller than those in the control test in all tests where pretreatment with Iodophores was performed (Table 4). The respective significance was in all test series below 0.001 for Betadine®, and for Braunol® it ranged between 0.001 and 0.1 after treatment with the 5% solution between 0.001 and 0.01, and after pretreatment with the 1% and 2% solution between 0.01 and 0.2 (Student-t-test).

2.5 Conclusions

These results clearly demonstrate that "GX" in the bactericidal working dilutions of 0.1% and 0.2% after 1-h duration of action is not impeding the proliferation potency of the pretreated tissue. The 0.4% solution of "GX" did not inhibit the proliferation rate, but led to obviously smaller proliferation zones indicating a reduction of proliferation potency.

In contrast to "GX" the Iodophores induced as well a decrease of the proliferation rates as a reduction of the

Tabelle 2:

Auswachsrate von Rattenherzexplantaten nach einstündiger Vorbehandlung mit Ringerlösung (Kontroll-explantate) resp. Jodophoren in verschiedenen Konzentrationen (Test-explantate). Jeder Versuch wurde mit 70-80 Explantaten durchgeführt.

Table 2:

Proliferation rates of rat heart explants after 1-hour pretreatment with Ringer's solution (control explants) as well as pretreatment with Iodophores respectively in different concentrations (test explants). Each test was performed on 70 to 80 explants.

HYGIENE+

2.5 Schlussfolgerungen

Diese Ergebnisse lassen eindeutig erkennen, daß „GX“ in den bakteriziden Gebrauchsverdünnungen von 0,1% und 0,2% nach einstündiger Einwirkungszeit die Proliferationspotenz des vorbehandelten Gewebes nicht beeinträchtigt. Die 0,4%-Lösung von „GX“ beeinträchtigte die Wachstumsrate nicht, bewirkte hingegen deutlich kleinere Auswachszone als Ausdruck einer Reduktion der Wachstumspotenz.

Im Gegensatz zu „GX“ bewirkten die Jodophore sowohl eine Herabsetzung der Auswachsrate als auch eine Verkleinerung der Wachstumszone. Die Zellproliferation *in vitro* war also nach Vorbehandlung mit beiden Jodophoren reduziert, wobei die Hemmwirkung von Betadine® größer war als die von Braunol®.

3 Experimentationsversuche mit fetalen Rattenhumeri

Neben den Weichteilen bilden vor allem auch Infektionen mit Knochenbeteiligung einen wichtigen Anwendungsbereich für lokale Antiseptika. Es lag darum nahe, bei der experimentellen Testung von „GX“ nach einem Modell zu suchen, das die Einwirkung auf Hartgewebe beurteilen läßt. So wählten wir für weitere *in vitro*-Versuche die Kultivierung fetaler Rattenhumeri, eine Methode, die am Laboratorium für Experimentelle Chirurgie in Davos von H. GERBER entwickelt worden war, und die wir für die weitere Prüfung der Gewebeverträglichkeit adaptierten.

3.1 Methodik

Pro Versuch wurden 18–19 Tage alte Rattenfeten aus einem Wurf verwendet. Die Humeri wurden freipräpariert. 6 Humeri wurden in dem zu testenden Antiseptikum, die 6 kontralateralen Humeri im Kulturmedium TBSS inkubiert. Inkubationsdauer 5, 30 und 60 Minuten. Anschließend wurden die Humeri in Kulturmedium TBSS gespült und während 7 Tagen *in vitro* kultiviert.

3.2 Beurteilungskriterien

3.2.1 Bestimmung der Humerusgröße

Am 7. Kulturtage, unmittelbar nach Versuchsabschluß, wurden die Humeri fotografiert und anschließend fixiert. Die Flächenbestimmung erfolgte anhand von vergrößerten Fotos (Vergrößerung 128fach, Abb. 3 und 4).

Versuchs-Nr. Test No.	Jodophor Iodophore	Konzentration in % Concentration in %	Mittelwert bewachsene Fläche in mm ² Mean value of areas with proliferative cells in mm ²	Kontroll- explantate Control explants	Test- explantate Test explants	Differenz Difference
TC 671/674	Braunol®	1,0	19,89	19,89	13,24	- 6,65
TC 732/746	Braunol®	2,0	25,25	25,25	23,26	- 1,99
TC 617/621	Braunol®	5,0	18,27	18,27	11,70	- 6,57
TC 634/636	Braunol®	5,0	25,62	25,62	13,42	-12,20
TC 776/771	Betadine®	1,0	17,72	17,72	12,28	- 5,44
TC 770/776	Betadine®	1,0	17,22	17,22	9,47	- 7,75
TC 770/772	Betadine®	2,0	17,22	17,22	8,99	- 8,23
TC 770/773	Betadine®	5,0	17,22	17,22	5,91	-11,31

Nach Vorbehandlung mit Jodophoren sind in allen Versuchen die Auswachszone signifikant kleiner.

After pretreatment with iodophores the proliferation zones in all tests are significantly smaller.

Tabelle 3:

Größe der Auswachszone nach einstündiger Vorbehandlung der Rattenherzexplantate mit Ringerlösung (Kontroll-explantate) resp. „GX“ in verschiedenen Konzentrationen (Test-explantate). Jeder Versuch wurde mit 70–80 Explantaten durchgeführt.

Tabelle 3:

Size of the proliferation zones after 1-hour pretreatment of the rat heart explants with Ringer's solution (control explants) as well as pretreatment with „GX“ in different concentrations respectively (test explants).

Each test was performed on 70 to 80 explants.

Versuchs-Nr. Test No.	„GX“ Kon- zentration in % „GX“ Con- centration in %	Mittelwert bewachsene Fläche in mm ² Mean value of areas with proliferative cells in mm ²	Kontroll- explantate Control explants	Test- explantate Test explants	Differenz Difference
TC 663/664	0,1	22,348	22,348	20,905	-1,428
TC 753/752	0,1	25,250	25,250	24,138	-1,112
TC 781/779	0,1	13,925	13,925	14,188	+0,263
TC 786/784	0,1	19,613	19,613	20,263	+0,650
TC 663/662	0,2	22,348	22,348	22,995	+0,652
TC 753/751	0,2	25,250	25,250	15,475*	-9,775*
TC 781/780	0,2	13,925	13,925	17,400	+3,475
TC 781/783	0,2	13,925	13,925	19,663*	+5,738*
TC 663/665	0,4	22,348	22,348	16,575*	-5,768*
TC 786/785	0,4	19,613	19,613	15,188*	-4,425*

* Statistisch signifikante Unterschiede
* Statistically significant differences

proliferation zones. The cell proliferation *in vitro* was also reduced after pretreatment with both iodophores whereby the inhibition effect of Betadine® was higher than that of Braunol®.

3 Experimentation Tests on Fetal Rat Humeri

Beside the soft-parts especially infections involving the bones present a wide field for the application of local antiseptics. Therefore, within the experimental testing of „GX“ it suggests itself to look for a pattern which allows for the evaluation of its effect on hard tissue. For further *in vitro* tests we chose the cultivation of fetal rat humeri, a method which had been developed at the Laboratory of Experimental Surgery in Davos by H. Gerber, and which was adapted by us for further testing of the tissue compatibility.

Tabelle 4:

Größe der Auswachszone nach einstündiger Vorbehandlung der Rattenherzexplantate mit Ringerlösung (Kontroll-explantate) resp. mit Jodophoren (Test-explantate). Jeder Versuch wurde mit 70–80 Explantaten durchgeführt.

Tabelle 4:

Size and proliferation zones after 1-hour pretreatment of the rat heart explants with Ringer's solution (control explants) as well as after pretreatment with iodophores respectively (test explants). Each test was performed on 70 to 80 explants.

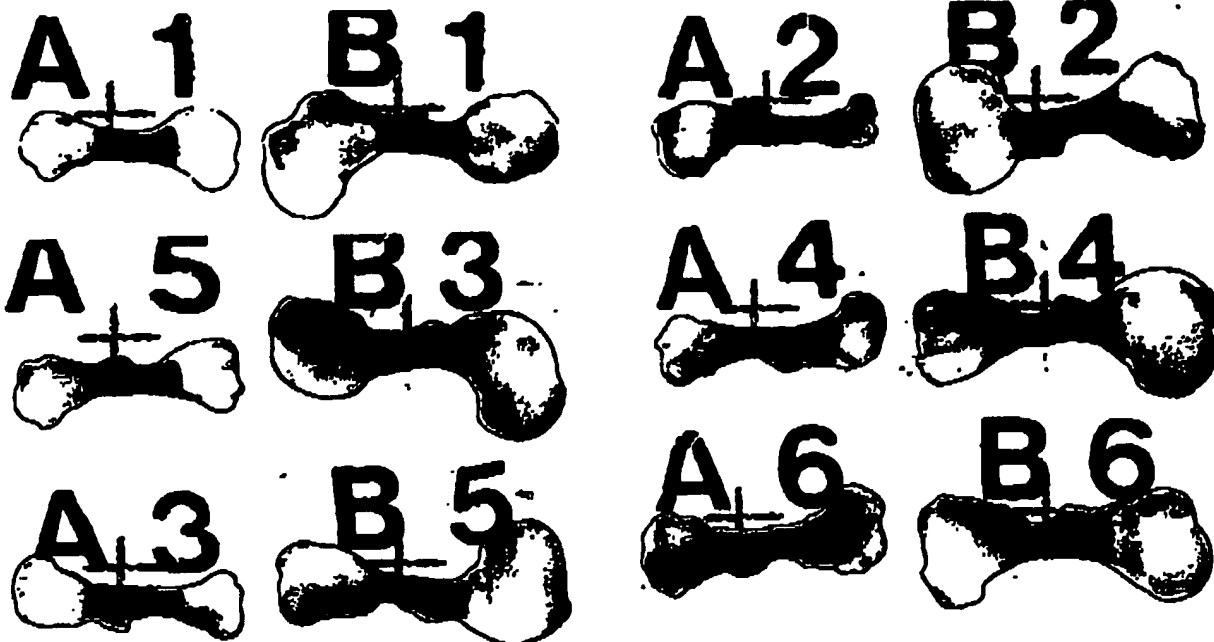


Abbildung 3:
Experiment TG 826 (Tabelle 6): Wachstumshemmung fetaler Rattenhumeri nach Inkubation von 30 min in „GX“ 0.1%
A = Versuchshumeri / B = Kontrollen

Figure 3:
Test TC 826 (Table 6): Inhibition of epiphyseal growth on fetal rat humeri after 30 min incubation in „GX“ 0.1%
A = Humeri in test / B = Humeri in control test

Abbildung 4:
Experiment TC 824 (Tabelle 6): Wachstumshemmung nach 60 min Inkubation in PVP-Jod 1%
A = Versuchshumeri / B = Kontrollen

Figure 4:
Test TC 824 (Table 6): Inhibition of growth after 60 min incubation in PVP-Iodine 1%
A = Humeri in test / B = Humeri in control test

Die Umrisse der Humeri wurden mit Tusche umrandet, die Konturen auf Millimeterpapier übertragen und die Fläche durch Auszählen der Quadrate ermittelt. Der Mittelwert von 6 Testhumeri wurde mit demjenigen der 6 kontralateralen Kontrollhumeri verglichen; die Signifikanz wurde nach R. A. Fischer (paired t-Test) bestimmt.

3.2.2 Bestimmung von Glukosaminoglukan im Kulturmedium

Glukosaminoglukan (GAG) ist ein Bestandteil der Knorpelmatrix. Es kann während der Kultivierung in vitro im Kulturmedium nachgewiesen werden. Die Bestimmung wurde nach WHITEMAN von Frau Dr. biol. E. REICHERT, Abteilung Präventivzahnheilkunde am Zahnärztlichen Institut Basel durchgeführt.

3.3 Geprüfte Substanzen

Die Humerusgröße wurde nach Vorbehandlung mit folgenden Antiseptika bestimmt: „GX“ 0.1%, Braunol® 1.0%, Tauralin® 2.0%, Chlorhexidin 0.2%.

Die Bestimmung von GAG im Kulturmedium beschränkte sich auf Versuche mit „GX“ 0.1% und Braunol® 1.0%.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Humerusgröße

In einer ersten Versuchsserie – zu Kontrollzwecken – wurde die Fläche von 4 fetalen Rattenhumeri vor der

3.1 Method

For each test 18 to 19-day old rat fetuses from the same brood were employed. The humeri were dissected. 6 humeri were incubated in the antiseptic to be tested, the 6 contralateral humeri were incubated in TBSS culture medium. The time-period of incubation was 5, 30 and 60 minutes. Afterwards the humeri were rinsed in the TBSS culture medium and were cultivated for 7 days in vitro.

3.2 Evaluation Criteria

3.2.1 Determination of the Size of the Humeri

On the 7th day of cultivation, immediately after termination of the test series the humeri were photographed and fixed. Area measurement was done by means of magnified photographs (magnification 128 x, Figures 3 and 4). The contours of the humeri were outlined by Indian ink, copied on graph paper, and the plane was determined by counting the squares. The mean value was compared to that one of the 6 contralateral humeri of the control test; the significance was determined by the paired t-test according to R. A. Fischer.

3.2.2 Determination of Glucosamine Glucan in the Culture Medium

Glucosamine glucan (GAG) is contained in the matrix of cartilage. Its presence in the culture medium can be proved during the cultivation in vitro. The determination

HYGIENE*

Tabelle 5:
Fläche fetaler Rattenhumeri bei Entnahme (18.-19. Fetaltag) und nach Kultivierung in vitro während 7 Tagen im Kulturmedium TBSS.

Table 5:
Plane of fetal rat humeri at the time of collection (18. to 19. fetal day and after cultivation in vitro during 7 days in TBSS culture medium.

Versuchs-Nr. Test No.	Fläche vor Kultivierung in mm ² area before cultivation in mm ²	Fläche nach Kultivierung kontralaterale Humeri in mm ² area after cultivation of contralateral humeri in mm ²	Wachstum Zunahme der Fläche Proliferation Extension of the area
BTC 824	3,60	14,48	4,02*
BTC 825	5,68	13,79	2,43*
BTC 826	4,97	16,66	3,35*
BTC 832	2,84	8,76	3,08*

Kultivierung und die der 4 kontralateralen Humeri nach 7 Tagen Kultivierung bestimmt. In dieser Zeit nimmt die Fläche um das 2,5- bis 4fache zu, vor allem durch Wachstum des Knorpelanteils (Tabelle 5).

Nach Vorbehandlung mit antiseptischen Lösungen war das Wachstum in vitro der Epiphyseanteile fetaler Rattenhumeri in allen Fällen deutlich herabgesetzt (Abb. 3 und 4, Tabelle 6).

3.4.2 Glukosaminoglykan im Kulturmedium

In 5 Versuchsserien wurde der Gehalt an Glukosaminoglykan (GAG) im Kulturmedium anlässlich des Mediumwechsels am 3., 5. und 7. Kulturtag bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. GAG war in allen Mediumproben nachweisbar, als Zeichen dafür, daß während der in vitro-Kultur Knorpelgrundsubstanz abgebaut wird. Bei 4 der 5 Kontrollserien stieg der Gehalt an GAG während der Kultivierung leicht an. Nach Vorbehandlung mit Antiseptika, besonders nach längerer Einwirkungsdauer derselben war der GAG-Anteil in der ersten Mediumprobe (3. Kulturtag) auffallend hoch, was für einen beschleunigten Abbau von Knorpelgrundsubstanz spricht.

was performed according to WHITEMAN by Mrs. R. REICHERT, Bsc. Biol., Department of Preventive Dentistry at the Institute of Dentistry, Basel.

3.3 Substances tested

The size of the humeri was determined after pretreatment with the following antiseptics: "GX" 0.1%, Braunol® 1.0%, Taurolin® 2.0%, chlorhexidine 0.2%.

The determination of GAG in culture medium was restricted to tests with "GX" 0.1% and Braunol® 1.0%.

3.4 Results

3.4.1 Size of Humeri

In a first test series - for control purposes - the plane of 4 fetal rat humeri was ascertained before cultivation and the plane of the 4 contralateral humeri after 7 days of cultivation (in TBSS). During this time the plane is enlarged 2.5 to 4 times especially due to the growth of the cartilage component (Table 5).

After pretreatment with antiseptic solutions the in vitro growth of epiphyseal parts of the fetal rat humeri was obviously reduced in all cases (Fig. 3 and 4, Table 6).

3.4.2 Glucosamine Glucan in Culture Medium

In 5 test series the contents of glucosamine glucan (GAG) in culture medium was measured at the occasion of the change of contrast medium on the 3rd, 5th and 7th day of cultivation. The results are compiled in Table 7. GAG could be found in all samples of the medium, a fact indicating that during the in vitro culture cartilage substance is disintegrated. In 4 of the 5 control series the contents of GAG increased during the cultivation period. After pretreatment with antiseptics, especially after a long period of action, the portion of GAG was surprisingly high in the first medium sample (3rd day of cultivation), which can be interpreted as a sign for an accelerated disintegration of cartilage substance.

Versuchs- Nr. Test No.	Antiseptische Lösung Antiseptic solution	Konz. in % Concentr. in %	Einwirkungs- zeit in min Duration of action in min	Humerusfläche in mm ² Area of humeri in mm ²	Kontrollhumeri Control humeri	Testhumeri Test humeri	Differenz Difference
TC 847	„GX“	0,1	5	7,699	6,892	-0,807	
TC 833	„GX“	0,1	5	11,375	9,897	-1,478	
TC 826	„GX“	0,1	30	13,658	6,477	-7,182	
TC 822	„GX“	0,1	60	11,283	6,096	-5,186	
TC 832	Braunol®	1,0	5	8,759	8,878	+0,118	
TC 824	Braunol®	1,0	60	14,482	8,019	-6,463	
TC 846	Taurolin®	2,0	5	7,689	5,748	-1,941	
TC 840	Taurolin®	2,0	30	10,011	7,476	-2,535	
TC 839	Taurolin®	2,0	60	9,919	7,278	-2,644	
TC 848	Chlorhexidin	0,2	60	7,389	3,934	-3,455	

Die Unterschiede sind außer bei Versuch TC 832 statistisch signifikant.

The differences are statistically significant with the exception of test TC 832.

Tabelle 6:
Wachstum fetaler Rattenhumeri nach Vorbehandlung mit antiseptischen Lösungen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Humern. Kriterium: Fläche der am 7. Kulturtag fotografierten Humeri in mm². Mittelwerte von je 6 Humern.

Table 6:
Growth of fetal rat humeri after pretreatment with antiseptic solutions in comparison to non-pretreated humeri. Criterion: Area of the humeri as photographed on the 7th day of cultivation in mm². Mean value of 6 humeri each.

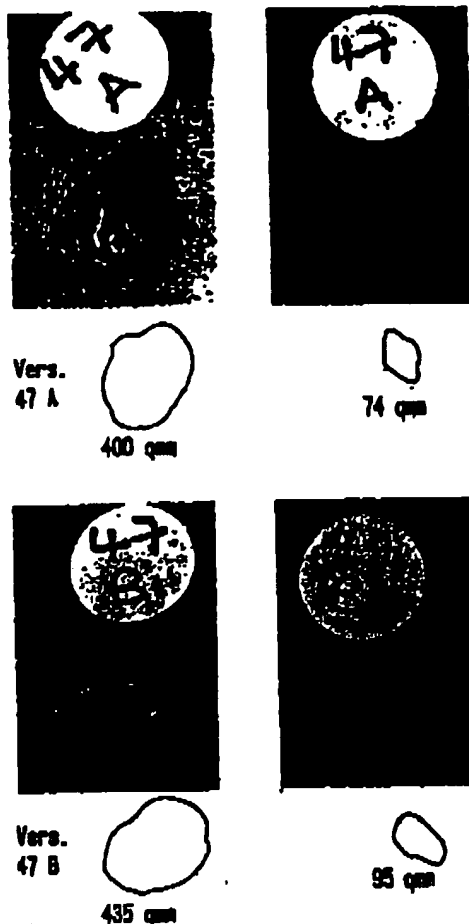


Abbildung 5:
Morphometrische Beurteilung der Restwunden auf standardisierten Fotos, 4,5fache Vergrößerung

Figure 5:
Morphometric evaluation of the residual wounds on standardized photos, magnification 4.5x

3.5 Schlußfolgerungen

Fetaler Knorpel erfährt offensichtlich durch den Kontakt mit Antiseptika eine Schädigung, die sich in Hemmung des Epiphysenwachstums und gesteigertem Abbau von Knorpelgrundsubstanz äußert. Auch wenn sich dieses Versuchsmodell vorläufig nur auf ein embryonales Substrat bezieht, dürfen wir aus klinischer Sicht diese Ergebnisse nicht übersehen. Um alle Unsicherheiten a priori auszuschließen, haben wir darum empfohlen, die Spülung von aseptischen Gelenken mit chemischen Antiseptika und vermutlich Antibiotika grundsätzlich als Kontraindikation einzustufen (18).

4 Wundheilungsversuche

Zur Erhärtung der in vitro-Ergebnisse erfolgte die weitere Testung der Gewebeverträglichkeit an experimentellen Wunden bei männlichen Meerschweinchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 281,1 g (10).

3.5 Conclusions

Fetal cartilage is obviously damaged by contact with antiseptics, a fact manifesting itself by inhibition of the epiphyseal growth and increased disintegration of the basic cartilage substance. Even if this test pattern is related to an embryonic substrate, from the clinical point of view we are not allowed to overlook these results. In order to exclude all uncertainties a priori we recommended to classify the rinsing of aseptic joints with chemical antiseptics and antibiotics as contraindicated (18).

4 Tests on Wound Healing

In order to substantiate the in vitro results further testing of tissue compatibility was performed on experimental wounds of male guinea-pigs with an average weight of 281.1 g (10).

4.1 Methods

Under anaesthesia with Nembutal on each of both sides of the column vertebrae three standardized wounds were set by a rotating cylindrical form, 6 mm in diameter gauge. The stamped circular piece of skin comprised cutis and subcutis, whereby the musculature lying beyond as well as the tender fibrous cover were left intact. The wounds were labelled immediately and coloured photographs were taken according to the standardized technique, which were magnified 4.5 times in order to guarantee exact planimetric measurement. (Fig. 5, left). Then the wounds were covered with perforated gauze strap.

4.1.1 Wound Treatment

Immediately after the operation the protective bandage was soaked in the solution to be tested, the same procedure was performed on the following days two times daily, in the morning and in the evening. In each animal two different test solutions were tried at the same time, one of the solutions was tested on the three wounds on the left side of the column vertebrae, the other on the right side. Each procedure was tested on 12 wounds. The animals were sacrificed on the 10th postoperative day. The coloured pictures of the residual wounds (Fig. 5, right) were also performed with 4.5 magnification for macroscopic clinical evaluation of the wound healing process.

4.2 Evaluation Criteria

4.2.1 Size of the Residual Wounds

On the magnified coloured photographs the wounds immediately after operation and the residual wounds were outlined, the contours were copied on graph paper and the planes were measured (Fig. 5).

4.2.2 Histological Evaluation

Each residual wound was elaborated histologically. Out of the zone with the largest extension 5 section preparations were evaluated histologically and histomorphometrically. The evaluation was done on 100 times magnified coloured photographs by the same histologist, who was not informed about the procedure (Fig. 6). In accordance with the literature (6) the histomorphometric evaluation included 4 tissue zones the planes of which were noted in per cent of the total cut surface measured:

HYGIENE



Abbildung 6:
Histologisches Bild einer epithelialisierten Wunde im Stadium der Reparation mit eingezeichneten Zonen. Wundbehandlung mit Braunol® 2%. Färbung nach Goldner. Zur Illustration wurde eine Aufnahme mit Orig.-Vergr. 40fach und Fotovergr. 5fach gewählt.

Figure 6:
Histological picture of an epithelialized wound in the phase of repair with zones marked in. Wound treatment with Braunol® 2%. Staining according to Goldner. For illustration a photograph with 40x magnification of the original and 5x magnification of the photograph was chosen.

4.1 Methodik

In Nembutal-Narkose wurden beidseits der Wirbelsäule je 3 standardisierte Wunden mit einem rotierenden, zylinderförmigen Hohlmesser von 6 mm Durchmesser gesetzt. Das ausgestanzte, kreisrunde Hautstückchen umfaßte Cutis und Subcutis, ließ darunterliegende Muskulatur und den feinen bindegewebigen Überzug intakt. Die Wunden wurden sofort bezeichnet, nach standardisierter Technik farbig fotografiert, und die Bilder im Interesse einer möglichst genauen planimetrischen Meßtechnik 4,5fach vergrößert (Abb. 5 links). Dann wurden die Wunden mit perforiertem Gaze-Heftpflaster abgedeckt.

4.1.1 Wundbehandlung

Sofort nach der Operation wurde der Deckverband mit der zu testenden Lösung gründlich durchtränkt, desgleichen wurde an den folgenden Tagen 2mal täglich morgens und abends verfahren. Bei jedem Tier wurden

1. Hemorrhagic zones
2. Granular tissue
3. Young, cell-rich connective tissue containing fibroblasts and a small amount of collagen fibrils
4. Mature connective tissue with dense collagen fibres and fibrocytes

4.3 Substances tested

All antiseptics were diluted with Ringer's solution. The basic solutions were "GX" and the commercial preparation of Braunol® with an iodine contents of 10%. The data given in per cent are related to the iodine contents as far as Braunol® is concerned.

The following solutions were tested:

"GX"	0.1%	0.2%	0.4%
Braunol®	1.0%	2.0%	5.0%

Ringer's solution was employed for control purposes

"Nihil" = dry strap for control purposes

Tabelle 7:

Nachweis von Glucosaminoglykan im Kulturmedium von in vitro kultivierten Rattenhumeri nach Vorbehandlung mit antiseptischen Lösungen. Die Kontrollhumeri wurden vor der Explantation gleich lang in Kulturmedium inkubiert. Mittelwerte von je 6 Humeri.

Table 7:

Evidence of glucosamine glycan in culture medium of in vitro cultivated rat humeri after pretreatment with antiseptic solutions. All control humeri were incubated in culture medium for the same time-period. Mean value of 6 humeri each.

Versuchs-Nr. Test No.	Antiseptische Lösung Antiseptic solution	Konz. in % Concentr. in %	Zeit in min Duration in min	GAG µg/ml im Kulturmedium GAG µg/ml in culture medium					
				3. Kulturtag 3. day of culture		5. Kulturtag 5. day of culture		7. Kulturtag 7. day of culture	
				Kontr. Contr.	Testhumeri Test humeri	Kontr. Contr.	Testhumeri Test humeri	Kontr. Contr.	Testhumeri Test humeri
BTC 838	"GX"	0,1	5	12,738	22,333	14,470	27,258	26,913	12,675
BTC 826	"GX"	0,1	30	9,642	32,690	13,748	19,317	13,555	3,512
BTC 822	"GX"	0,1	60	17,573	59,720	33,035	8,448	35,400	2,285
BTC 832	Braunol®	1,0	5	6,625	6,788	5,707	6,347	5,352	6,607
BTC 824	Braunol®	1,0	60	13,562	19,903	15,990	10,840	16,392	11,113

A. Kallenberger, Chr. Kallenberger und H. Willenegger: Experimentelle Untersuchungen zur Gewerbeverträglichkeit von Antisepika

HYGIENE+
Antisepika

Verfahren Procedure		Mittelwerte Mean values		Differenz Difference	t	P
A	B	A	B	A-B		
nihil	Ringer	118,78 ± 49,55	72,83 ± 56,22	+45,95	1,6695	Ø
nihil	„GX“ 0,2%	118,78 ± 49,55	49,67 ± 48,01	+69,11	3,2206	<0,01
nihil	„GX“ 0,4%	118,78 ± 49,55	81,25 ± 35,00	+37,53	2,0285	Ø
nihil	Braunol® 2%	118,78 ± 49,55	54,50 ± 40,80	+64,28	3,2616	<0,01
nihil	Braunol® 5%	118,78 ± 49,55	104,40 ± 17,50	+14,38	0,9359	Ø
Ringer	„GX“ 0,2%	72,83 ± 56,22	49,67 ± 48,01	+23,16	0,9135	Ø
Ringer	„GX“ 0,4%	72,83 ± 56,22	81,25 ± 35,00	- 8,42	0,3985	Ø
Ringer	Braunol® 2%	72,83 ± 56,22	54,50 ± 40,80	+18,33	0,7940	Ø
Ringer	Braunol® 5%	72,83 ± 56,22	104,40 ± 17,50	-31,57	1,8246	Ø
„GX“ 0,2%	„GX“ 0,4%	49,67 ± 48,01	81,25 ± 35,00	-31,58	1,8413	Ø
„GX“ 0,2%	Braunol® 2%	49,67 ± 48,01	54,50 ± 40,80	- 4,83	0,2657	Ø
„GX“ 0,2%	Braunol® 5%	49,67 ± 48,01	104,40 ± 17,50	-54,73	2,8116	<0,05
„GX“ 0,4%	Braunol® 2%	81,25 ± 35,00	54,50 ± 40,80	+26,75	1,7237	Ø
„GX“ 0,4%	Braunol® 5%	81,25 ± 35,00	104,40 ± 17,50	-23,15	2,0506	Ø
Braunol® 2%	Braunol® 5%	45,50 ± 40,80	104,40 ± 17,50	-49,90	3,8950	<0,01

Anmerkung: Wegen einer „Fotopanne“ konnten die Restwunden der mit „GX“ 0,1% und Braunol® 1,0% behandelten Tiere nicht ausgemessen werden. In den Versuchsprotokollen wurden sie ausnahmslos als „extrem klein“ vermerkt.

Remark: Due to a mishap during photographing the residual wounds of those animals treated with „GX“ 0,1% and Braunol® 1,0% could not be measured. In the test protocols they were indicated as „extremely small“.

gleichzeitig 2 verschiedene Testlösungen geprüft, die eine an den 3 Wunden links, die andere an den 3 Wunden rechts der Wirbelsäule. Jedes Verfahren wurde an 12 Wunden getestet. Die Opferung der Tiere erfolgte am 10. postoperativen Tag. Von den Restwunden (Abb. 5 rechts) wurden Farbaufnahmen ebenfalls mit 4,5facher Vergrößerung, zur makroskopischen (klinischen) Auswertung der Wundheilung angefertigt.

4.2 Beurteilungskriterien

4.2.1 Größe der Restwunden

Auf den vergrößerten Farbfotos wurden Operations- und Restwunden umrandet, die Konturen auf Millimeterpapier übertragen und die Fläche ausgemessen (Abb. 5).

4.2.2 Histologische Beurteilung

Jede Restwunde wurde histologisch verarbeitet. Aus der Zone der größten Ausdehnung wurden 5 Schnitte histologisch und histomorphometrisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte an 100fach vergrößerten Farbfotos stets durch die gleiche Histologin, in Unkenntnis des Verfahrens (Abb. 6). In Anlehnung an die Literatur (6) erfasste

Tabella 9:
Histomorphometrische Analyse der Wundheilung unter lokaler Behandlung mit verschiedenen Antisepika

Wundbehandlung Wound treatment	Gewebeanteil in Prozent der beurteilten Fläche (MW von 12 Wunden) Tissue portion of the evaluated areas in % (Mean value of 12 wounds)				
	hämorrhag. Zonen hemorrhagic zones	Granulations- gewebe granular tissue	Bindegew. 1 zellreich connective tissue 1 cell-rich	Bindegew. 2 faserreich connective tissue 2 fibrous	Bindegewebe total connective tissue total
nihil	7,8 ± 11,3	27,5 ± 14,0	33,0 ± 17,5	31,7 ± 25,5	64,7 ± 13,0
Ringer	6,5 ± 12,2	0,3 ± 1,0	22,5 ± 12,3	70,7 ± 17,9	93,2 ± 12,1
„GX“ 0,1%	1,0 ± 3,5	10,7 ± 13,3	35,3 ± 20,2	52,9 ± 31,5	88,2 ± 14,4
„GX“ 0,2%	3,7 ± 5,9	14,7 ± 8,5	34,9 ± 15,2	46,7 ± 17,9	81,6 ± 12,4
„GX“ 0,4%	8,0 ± 8,8	24,1 ± 10,4	38,0 ± 11,2	29,9 ± 10,7	67,9 ± 12,4
Braunol® 1%	3,7 ± 9,1	13,2 ± 10,3	34,3 ± 13,1	48,8 ± 13,5	83,1 ± 15,7
Braunol® 2%	5,1 ± 10,1	23,8 ± 11,0	35,9 ± 14,1	35,2 ± 21,3	71,1 ± 15,5
Braunol® 5%	26,7 ± 19,3	50,5 ± 27,8	20,8 ± 19,8	2,1 ± 5,8	22,9 ± 21,4

Tabella 8:
Größe der Restwunden in mm²
der standardisierten Fotos:
Vergleich, Statistik.

Table 8:
Extension of the residual
wounds in mm² of the standar-
dized photos: Comparison, Sta-
tistics.

4.4 Results

4.4.1 Size of the Residual Wounds (Table 8)

The largest residual wounds in average were found among the untreated wounds, i.e. the healing process was clearly retarded in these cases. After treatment with „GX“ 0,2% and Braunol® 2,0% the residual wounds were significantly smaller. After treatment with Braunol® 5,0%, a solution which is in common practical use, the residual wounds were significantly larger as those treated with „GX“ 0,2% and Braunol® 2,0% and could be compared to those wounds which have not been treated at all. The same results were obtained by applying „GX“ 0,4%.

4.4.2 Histomorphometric Evaluation

The results are compiled in Table 9. The highest degree of maturity was obtained by the repair tissue after wound treatment with Ringer's solution showing an amount of mature connective tissue of 70.7%. A little less, but not significantly less was the portion of mature connective tissue after treatment with „GX“ 0,1%. In all other pro-

Table 9:
Histomorphometric analysis of wound healing under local treatment with different antiseptics

HYGIENE+

die histomorphometrische Auswertung folgende 4 Gewebesebenen, deren Fläche in Prozent der total ausgemessenen Schnittfläche angegeben wurde:

1. Haemorrhagische Zonen
2. Granulationsgewebe
3. Junges, zellreiches Bindegewebe mit Fibroblasten und niedrigem Anteil an kollagenen Fibrillen
4. Reifes Bindegewebe mit dichten kollagenen Fasern und Fibrozyten

4.3 Geprüfte Substanzen

Alle Antiseptika wurden mit Ringerlösung verdünnt. Ausgangslösungen waren „GX“ und Braunol®-Handelsform mit einem Gehalt von 10% Jod. Die Prozentangaben beziehen sich beim Braunol® auf den Jodgehalt.

Folgende Lösungen wurden getestet:

„GX“	0,1%	0,2%	0,4%
Braunol®	1,0%	2,0%	5,0%

Ringerlösung als Kontrolle

„Nihil“ – trockener Wundverband als Kontrolle

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Größe der Restwunden (Tab. 8)

Die durchschnittlich größten Restwunden fanden sich bei den unbehandelten Wunden, d. h. die Wundheilung war bei diesen deutlich verzögert. Nach Behandlung mit „GX“ 0,2% und Braunol® 2,0% waren die Restwunden signifikant kleiner. Nach Behandlung mit Braunol® 5,0%, eine Lösung, die in der Praxis oft benutzt wird, waren die Restwunden signifikant größer als nach Behandlung mit „GX“ 0,2% und Braunol® 2,0% und lagen im Bereich der unbehandelten Wunden. Das gleiche galt auch für „GX“ 0,4%.

4.4.2 Histomorphometrische Auswertung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Den höchsten Reifegrad erreichte das reparative Gewebe nach Wundbehandlung mit Ringerlösung mit einem Anteil an reifem Bindegewebe von 70,7%. Etwas, aber nicht signifikant niedriger, war der Anteil an reifem Bindegewebe nach Behandlung mit „GX“ 0,1%. Bei allen anderen Verfahren war er schwach signifikant („GX“ 0,2%) bis hoch signifikant niedriger („GX“ 0,4%, Braunol® 2,0% und 5,0%, nihil).

Entsprechend war der Anteil an Granulationsgewebe nach Ringerlösung extrem niedrig (0,3%), wobei der Unterschied gegenüber „GX“ 0,1% schwach signifikant, gegenüber allen anderen Verfahren hoch signifikant war. Auffallend war, daß sich ausgedehnte hämorrhagische Zonen nur nach Wundbehandlung mit Braunol® 5,0% fanden, so daß hier sogar an eine Gefäßschädigung gedacht werden muß.

4.5 Schlußfolgerungen

Vergleicht man bindegewebig organisiertes reparatives Gewebe (Bindegewebe total) mit dem Anteil an unreifem Ersatzgewebe (Granulationsgewebe und hämorrhagische Zonen), so zeigt sich eindeutig, daß die Behandlung

cedures it ranged from slightly significant („GX“ 0,2%) to definitely significantly lower („GX“ 0,4%, Braunol® 2,0% and 5,0%, nihil).

The portion of granular tissue was, accordingly, extremely low after application of Ringer's solution (0,3%), whereby the difference was slightly significant in comparison to „GX“ 0,1%, and was highly significant in comparison to all other procedures. It was striking that extended hemorrhagic zones were just to be found after wound treatment with Braunol® 5,0% so that in this case even vessel lesion cannot be excluded.

4.5 Conclusions

If one compares fibrously structured repair tissue (connective tissue in total) with the amount of immature substitutive tissue (granular tissue and hemorrhagic zones) it becomes evident that the treatment by „GX“ in the definitely bactericidal concentration of 0,1% and 0,2% did not cause any delay in wound healing. After treatment with „GX“ 0,4% and Braunol® 2,0% the maturation degree was comparable to that of the untreated wounds. Clearly retarded was the healing process after Braunol® 5,0%.

It can be stated that the test on wound healing confirm the results of the in vitro investigations, i.e. that the bactericidal working solutions of „GX“ (0,1% and 0,2%) reveal extreme tissue compatibility and that in this point they are clearly superior to the bactericidal solutions of the iodophores.

Summary

Chemical antiseptics are only applicable in the local treatment of wounds if they do not lead to essential damages of the wound bed. Therefore, the tissue compatibility of a recently developed antiseptic on biguanide basis by name of Lavasept, which seemed suitable for the local treatment of wounds due to its extremely good antiseptic properties, was tested experimentally prior to the clinical trial.

The study was arranged as a comparative test between Ringer's solution, and other antiseptics which are already in clinical use as e.g. Iodophore Betadine® and Braunol® as well as chlorhexidine and Tauralin®. The tests were performed in vitro investigating on explanted rat heart tissue and fetal rat humeri and was supplemented by wound-healing test on guinea-pigs.

In the tests performed on rat heart tissue as well as in the wound-healing test the antiseptic solutions of Lavasept showed extremely good tissue affinity and were in this point significantly superior to the group of Iodophores in bacteriologically efficient concentration. The growth of cartilage, however, was inhibited by all antiseptics tested so that the application of antiseptics whenever the joints are not infected, is not advisable in order to exclude possible disturbances from the beginning.

Statistical evaluation by PD Dr. rer. pol. R. Zehnder (†), former head of the AO Head Office for Documentation, Bern.

A. Kallenberger, Chr. Kallenberger und H. Willenegger: Experimentelle Untersuchungen zur Gewerbeverträglichkeit von Antiseptika

HYGIENE
HEFT 12

mit den bakteriziden Konzentrationen von „GX“ 0,1% und 0,2% keine Verzögerung der Wundheilung bewirkte. Nach Behandlung mit „GX“ 0,4% und Braunol® 2,0% entsprach der Reifegrad dem der unbehandelten Wunden. Eindeutig verzögert war hingegen die Wundheilung nach Braunol® 5,0%.

Damit bestätigen die Wundheilungsversuche die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen, wonach die bakteriziden Gebrauchslösungen von „GX“ (0,1% und 0,2%) ausgesprochen gewebefreundlich und darin den bakteriologisch wirksamen Lösungen von Jodophoren deutlich überlegen sind.

Zusammenfassung

Antiseptika können zur lokalen Wundbehandlung nur verwendet werden, wenn sie das Wundbett nicht wesentlich schädigen. Die Gewebeverträglichkeit eines neu entwickelten Antiseptikums auf Bignamidbasis unter der Bezeichnung Lavasept, das wegen seiner guten bakteriziden Eigenschaften für die lokale Wundbehandlung geeignet erschien, wurde deshalb, vorgängig der klinischen Erprobung, experimentell geprüft.

Als Vergleich dienten Ringarlösung und bereits klinisch verwendete Antiseptika (die Jodophore Betadine® und Braunol® sowie in einigen Versuchen Chlorhexidin und Tauridin®). Die Testung erfolgte *in vitro* an explantiertem Rattenherzgewebe und an fetalen Rattenhumeri. Sie wurde ergänzt durch Wundheilungsversuche an Meerschweinchen.

Zusammenfassend betrachtet erwiesen sich die bakteriziden Lösungen von Lavasept in den Versuchen mit Rattenherzgewebe und in den Wundheilungsversuchen als ausgesprochen gewebefreundlich. Sie waren darin den bakteriologisch wirksamen Konzentrationen von Jodophoren signifikant überlegen. Hingegen wird das Knorpelwachstum durch alle getesteten Antiseptika gehemmt, so daß von einer Verwendung von Antiseptika bei nicht infizierten Gelenken grundsätzlich abgeraten wird, um alle Unsicherheiten a priori auszuschließen.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn PD Dr. rer. pol. R. Zehnder (†), ehemaliger Leiter der AO-Dokumentationszentrale, Bern.

Literatur / References

1. BARTMANN, K.: Antimikrobielle Chemotherapie. Heidelberg Taschenbücher Bd. 137. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974
2. BASSETTI, C., and A. KALLENBERGER: Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. A histomorphometric study on experimental animals. *J. clin. Periodontol.* 7 (1980) 443-456
3. BONNIN, J. G., and W. R. LI FANG: Joseph Lister, a bibliographical Biography. *Journal of Bone & Joint Surg.* 49 B (1967)
4. CARREL, A.: In: A. Sartory, *Le Traitement des plaies de guerre*. Librairie Militaire Berger-Levrault, Paris, Nancy, 1917
5. GOOD, H.: Charakterisierung der Desinfektionsmittel. Aktuelle Probleme der Chirurgie und Orthopädie. Bd. 12, Huber Bern, Stuttgart, Wien, 1979
6. HERNANDEZ-RICHTER, H. J., und H. STRUCK: Die Wundheilung. Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, 1970
7. HIERHOLZER, G., und G. GÖRTZ: PVP-Jod in der Medizin. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 1984
8. KALLENBERGER, A.: Experimentelle Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit von Desinfektionslösungen. Aktuelle Probleme in der Chirurgie und Orthopädie Bd. 12, Huber Bern, Stuttgart, Wien, 1979
9. KALLENBERGER, A., W. ROTH und A. LEDERMANN: Experimentelle und bakteriologische Untersuchungen zur Wahl des Spülmittels für die antibakterielle Spüldrainage. In: G. Hierholzer und J. Rehn (Hrsg.): Die posttraumatische Osteomyelitis, S. 79, Schattauer, Stuttgart, New York, 1970
10. KALLENBERGER, C.: Wundheilung unter lokaler antiseptischer Behandlung: Vergleich eines jodfreien Antiseptikums mit PVP-Jod. Eine histomorphometrische Studie an Hautläsionen bei Meerschweinchen. Dissertation, Basel, 1983
11. KOCHER, Th.: Die antiseptische Wundbehandlung mit schwachen Chlorzinklösungen in der Berner Klinik. In: R. Volkmann (Hrsg.): Sammlung klinischer Vorträge, Verlag Breitkopf & Härtel, 1881
12. LISTER, J.: Der Lister'sche Verband, übersetzt von O. Thambayn. Verlag von Veith & Co., Leipzig, 1875
13. LISTER, J.: Joseph Lister's Erste Veröffentlichungen über antiseptische Wundbehandlung (1867, 1868, 1869). Übersetzt von F. Trendelenburg (Hrsg.). In: *Klassiker der Medizin* Bd. 12, Verlag Joh. Ambrosius Barth, Leipzig 1912
14. MACKENZIE, C.: The effect of oral administration of chlorhexidine on the rate of regeneration of epithelia of the oral mucosa and skin of mice. *J. of Periodontol.* 9 (1974) 181-187
15. OERLEHT, W.: Die Zellneubildung im Epithel und im Granulationsgewebe bei der Wundheilung. In: Wundheilung und Wundnaht. Urban und Schwarzenberg, München, 1966
16. PALINI, K. U., M. KNUUTTILA und H. MURILTYINEN: The Effect of Chlorhexidine Gluconate on the Formation of Experimental Granulation Tissue. *J. Periodontol.* 49 (1978) 92-95
17. PRINGLE, J.: Beobachtungen über die Krankheiten der Arme. Übersetzt von A. E. Branda. Richtersche Buchhandlung, Altenburg, 1772
18. ROTH, B., J. MÜLLER und H. WILLENEGGER: Intraoperative Wundspülung mit einem neuartigen lokalen Antiseptikum. *Helv. chir. Acta* 52 (1985) 61
19. WERNER, H.-P., und CH. ENGLEHARDT: Problematik der Inaktivierung am Beispiel des *in vitro*-Tests. *Hyg. + Med.* 3 (1978) 326-330

Anschriften der Verfasser/Address of the Authors

PD Dr. med. Alice Kallenberger
chem. Abteilung für Histologie und Zytologie des Zahnärztlichen
Instituts der Universität Basel
Dr. med. dent. Christian Kallenberger
Neuwellerstraße 36
CH-4105 Benken
Prof. Dr. med. Dres. h.c. mult. Hans Willenegger
AO-International
Baklerstraße 30
CH-3007 Bern